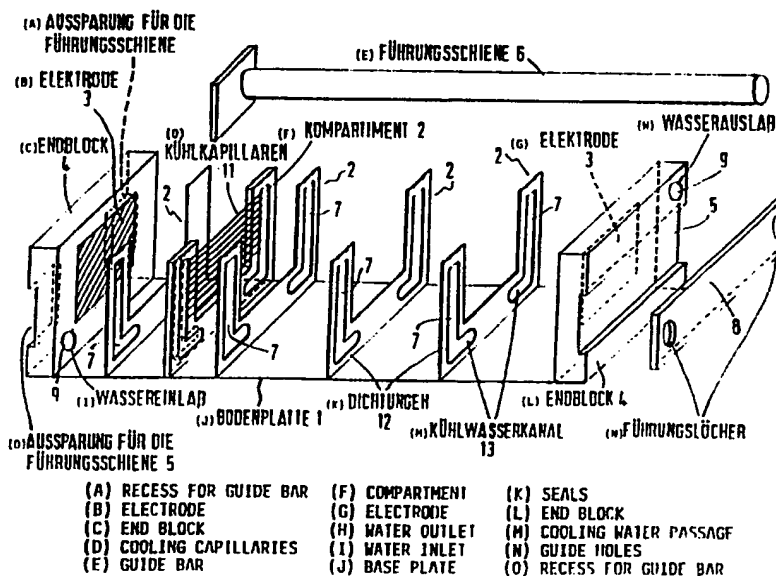


**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : B01D 57/02, G01N 27/26	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/00795 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Januar 1992 (23.01.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/01219 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juni 1991 (29.06.91) (30) Prioritätsdaten: P 40 21 728.0 7. Juli 1990 (07.07.90) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SERVA FEINBIOCHEMICA GMBH & CO. [DE/DE]; Post- fach 105 260, D-6900 Heidelberg 1 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : RADOLA, Bertold [DE/ DE]; Erkweg 8, D-8000 München 81 (DE). (74) Anwalt: BOEHRINGER INGELHEIM KG; Postfach 200, D-6507 Ingelheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (euro- päisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (eu- ropäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: DEVICE FOR PREPARATORY ELECTROPHORESIS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG FÜR DIE PRÄPARATIVE ELEKTROPHORESE

MODULAR SEPARATION CHAMBER
TRENNKAMMER MIT MODULAREM AUFBAU

(57) Abstract

An electrophoresis chamber of modular design with capillary cooling system non-dependent on chamber size.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Elektrophoresekammer mit modularem Aufbau und einem dimensionsunabhängigen Kapillarkühlsystem.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Vorrichtung für die präparative Elektrophorese

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für die präparative Elektrophorese und insbesondere ein dimensions-unabhängiges Kühlsystem für diese Vorrichtung.

Die Elektrophorese ist die zur Zeit leistungsfähigste analytische Methode für die Trennung von Proteinen. Man kennt auch zahlreiche Techniken der präparativen Elektrophorese, die jedoch überwiegend für Trennungen in einem Maßstab von Milligramm-Mengen von Proteinen eingesetzt werden. Ein Hauptproblem bei der Maßstabserweiterung ("scale up") ist die Ableitung der beim Stromdurchgang entstehenden Joule'schen Wärme. Eine besonders erfolgreiche Technik ist die präparative isoelektrische Fokussierung in Schichten granulierter Gele, mit deren Hilfe Gramm-Mengen von Proteinen mit hoher Auflösung getrennt werden konnten (Radola, B.J., Methods Enzymol. 1984, 104, 256-275).

In diesem Trennsystem ist die Schichtdicke auf ca. 1 cm begrenzt, auch kann die Trennstrecke nicht verlängert werden, so daß das Trennvolumen lediglich durch Variation der Breite der Schicht vergrößert werden kann. Einer solchen Maßstabserweiterung sind aber enge praktische Grenzen gesetzt. Auch andere aus der Literatur bekannte präparative Systeme mit zylindrischer Geometrie lassen sich weder bei radialer noch axialer Kühlung in einen größeren Maßstab übertragen (Rilbe, H. und Petterson, S., in: Arbuthnott, J.P. und Beeley, J.A. Isoelectric Focusing, Butterworth, London 1975, pp. 44 - 57).

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Vorrichtung für die präparative Elektrophorese zur Verfügung zu stellen, die die Trennung von größeren Substanzmengen ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird eine Vorrichtung zur präparativen Elektrophorese vorgeschlagen, die durch einen modularen Aufbau der Elektrolytkammer aus einer Vielzahl von einzelnen Kompartimenten gekennzeichnet ist, wobei die Kompartimente durch Trennelemente mit membranartigen Eigenschaften verknüpft sind, und wobei jedes Kompartiment ein aus parallel angeordneten Kapillaren bestehendes Kühlelement enthält.

Ein wesentlicher Bestandteil jedes Kompartiments - das den Elektrolyten enthält - ist ein aus Kapillaren aufgebautes Kühlelement, bei dem dünne Kapillaren parallel zueinander angeordnet sind, so daß der Abstand zueinander wie auch zu den Begrenzungsflächen des Kompartiments an keiner Stelle mehr als wenige Millimeter beträgt. Die Begrenzungsfläche des Kompartiments wird durch das angrenzende Element (auch als Trennelement bezeichnet) mit den membranartigen Eigenschaften gebildet. Im allgemeinen beträgt der Abstand der Kapillaren zueinander zwischen 3 und 10 mm, bevorzugt zwischen 5 und 7 mm. Der Abstand zur nächsten angrenzenden Fläche - dem Trennelement zwischen zwei Kompartimenten - sollte nicht mehr als 5, bevorzugt nicht mehr als zwischen 1 und 3 mm betragen, wobei der Abstand von der Oberfläche der Kapillare aus gemessen wird. Der Durchmesser der Kapillaren sollte möglichst gering sein, wobei jedoch infolge der Materialeigenschaften und eines - zur Aufrechterhaltung eines effektiven Kühlflüssigkeitstransportes notwendigen - inneren Durchmessers technische Grenzen gesetzt sind. Im allgemeinen beträgt der äußere Durchmesser der Kapillaren zwischen 1 und 3 mm.

Eine wichtige Anforderung an die Eigenschaften der Kapillaren ist, daß sie elektrisch nicht leitend sind

und sich gegenüber den eingesetzten Chemikalien (Elektrolyt, Protein etc.) neutral und beständig verhalten.

Geeignete Materialien, aus denen Kapillaren bestehen können, sind beispielsweise Metalle, soweit sie außen mit elektrischen Nichtleitern beschichtet sind, so z.B. mit Kunststoffen (Polyethylen, Teflon etc.), Kunststoffe und Glas.

Die Kühlung der Kapillaren ist eine Funktion der Länge, Wandstärke, Wärmeleitfähigkeit des Materials, der Durchflußgeschwindigkeit und Leistung der Kühlaggregate. Das erfindungsgemäße Kühlprinzip kann bis zu einem Gesamtvolumen von mindestens 100 Litern und mehr eingesetzt werden und wird in erster Linie durch die Länge der Trennstrecke und die damit aufzuwendende Trennzeit bestimmt. Trennzeiten von über 24 Stunden erscheinen nur bei besonderen Problemstellungen gerechtfertigt. Die Kühlleistung wurde in Kompartimenten mit unterschiedlicher Anordnung der Kapillaren (Abstand, Länge, Durchmesser, Material, Durchflußgeschwindigkeit der Kühlflüssigkeit, Schichthöhe) überprüft. Temperaturmessungen bei unterschiedlicher Belastung des Systems haben gezeigt, daß die Temperatur im ganzen System, auch an kritischen Stellen z.B. in der Nähe von Elektroden, bis zu einer Belastung von $0,3-0,4 \text{ Watt/cm}^3$ konstant ist. Diese Wattbelastung übertrifft um ein Vielfaches die bei der Elektrophorese zu erwartende Wärmeentwicklung.

Das erfindungsgemäße Kapillarkühlsystem wird auch als dimensions-unabhängiges Kühlsystem bezeichnet, da es infolge des modularen Aufbaus der Elektrolytkammer automatisch dem Volumen der Kammer angepaßt ist.

In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform bildet ein Kompartiment mit dem aus Kapillaren aufgebautem Kühlelement eine konstruktive Einheit, wobei das Kompartiment folgende konstruktiven Merkmale aufweist: Gegenüberliegende Seitenteile bilden zusammen mit einem Bodenteil einen flachen Rahmen, der im allgemeinen nach oben offen ist. Die Höhe der Seitenteile und die Länge des Bodenteils können in weiten Bereichen beliebig gewählt werden, wobei hiermit die Höhe und Breite der Innenmaße der Elektrophoresekammer definiert ist. Beispielsweise beträgt die Höhe 30 cm und Breite 40 cm, wobei die Außenmaße je nach eingesetzten Werkstoffen größer sind. Bevorzugte Werkstoffe sind chemisch resistente Kunststoffe, die sich mechanisch gut verarbeiten lassen, wie z.B. Plexiglas und Polyethylen. Die Kanten der gegenüberliegenden Seitenteile bilden zusammen mit den Kanten des Bodenteils jeweils eine Fläche, an die sich ein Trennelement anschließt. Der Abstand dieser beiden Flächen voneinander, d.h. die Dicke der Seitenteile und die des Bodenteils, ist durch die Kühlleistung des Kapillar-Kühlsystems vorgegeben. In der Regel beträgt der Abstand 2 bis 10 mm, bevorzugt 2 bis 5 mm. Die Anzahl der Kompartimente definiert die Trennleistung der Elektrophoresekammer. Bei vorgegebenem gleichen Volumen der Kammer bedeutet eine geringere Dicke des Kompartiments eine größere Anzahl von Kompartimenten und damit gleichzeitig eine verbesserte Trennleistung des Systems. Anzustreben ist somit ein Kompartiment geringer Dicke, jedoch sind diesem durch das Kapillarkühlsystem konstruktive Grenzen gesetzt.

In einer besonderen Ausführungsform weist das Bodenteil eine zunehmende Stärke auf, so daß im Innern des Kompartiments ein Gefälle entsteht, so daß die

Elektrolytlösung - gegebenenfalls zusammen mit dem getrennten Protein - vollständig über eine am tiefsten Punkt angebrachte Auslaßöffnung entleert werden kann.

Für den Fall, daß das Kompartiment und das aus Kapillaren gebildete Kühlelement eine konstruktive Einheit bilden (Abb.2), enthält jedes Seitenteil eine oder mehrere Aussparung(en) (Öffnungen). Durch den modularen Aufbau aus einer Vielzahl von Kompartimenten werden durch diese Aussparungen Kühlwasserkanäle gebildet, durch die die Kühlflüssigkeit auf einer Seite einströmt - durch die Kapillaren hindurch - und aus dem gegenüberliegenden Kühlwasserkanal herausströmt. Es ist selbstverständlich, daß die erfindungsgemäße - aus einzelnen Kompartimenten zusammengesetzte - Elektrophoresekammer Anschlüsse enthält, damit die Kühlwasserkanäle mit Kühlflüssigkeit versorgt werden können.

Wenn es erwünscht oder erforderlich ist, die Kühleistung zu erhöhen, können die Kapillaren jedes Kompartiments allein oder in Blöcken zusammengefaßt, separat mit Kühlflüssigkeit versorgt werden. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit kann - beispielsweise unter Verwendung von Kryostaten - dem sich ergebenden Trennproblem angepaßt werden, beispielsweise in einen Temperaturbereich zwischen 1 bis 30°C oder bei Tieftemperaturelektrophorese zwischen -10 bis -30°C. Bei Trennungen in Gegenwart hoher Polyolkonzentrationen liegt der bevorzugte Temperaturbereich um 20°C.

Die Kapillaren sind so mit den Seitenteilen verbunden, daß ein Kontakt zu dem Kühlwasserkanal besteht, jedoch keine Kühlflüssigkeit in das innere der Elektrophoresekammer dringen kann.

Die Grenzflächen zweier benachbarter Kompartimente werden gegeneinander durch ein Trennelement abgedichtet. Dementsprechend sind die Kanten der Seitenteile und die Kanten des Bodenteils jedes Kompartiments so gestaltet, daß sie eine abdichtende Funktion erfüllen und keine Elektrolyt-Flüssigkeit austreten kann. Sie können beispielsweise Dichtungsprofile aus Gummi oder einem anderen geeigneten Material - z.B. Teflon oder Silicon - enthalten.

Die Trennelemente dienen dazu, einen Flüssigkeitsaustausch zwischen benachbarten Kompartimenten zu unterbinden, während die zu trennenden Proteine diffundieren können, d.h. die Trennelemente erfüllen die Funktion einer Membran. Stoffe, die diese Membranfunktion aufweisen und zudem ausreichend mechanisch stabil sind, können verwendet werden. Geeignete Materialien sind beispielsweise poröse Polymerfilme, keramische Membranen, oder technische Gewebe, die mit einem sehr dünnen Gel überzogen sind. Solche Gewebe sind beispielsweise in der deutschen Offenlegungsschrift 37 36 087 beschrieben, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugt sind ultradünne gewebe gestützte Polyacrylamidgele oder Agarosegele mit einer Stärke von ca. 50 μm bis 2 mm, bevorzugt 50 bis 100 μm . Solche dünnen gewebe gestützten Gele können direkt zwischen zwei Kompartimente gelegt werden, ohne daß weitere konstruktive Maßnahmen zur Aufnahme eines Trennelements notwendig sind. Infolge des durch eine äußere

Spannvorrichtung ausgeübten Druckes sind die Gele zwischen den Kompartimenten fixiert. Die Fläche der Gele ist so dimensioniert, daß die Kühlwasserkanäle nicht verdeckt werden.

In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ist es vorgesehen, als Trennelemente dünne Rahmen mit einem fest verbundenen Gewebe zu verwenden, auf dem das Gel aufpolymerisiert werden kann. Diese Ausführungsform ermöglicht einen schnellen Aufbau der Elektrophoresekommer, bzw. einen einfacheren Austausch der Trennelemente. Es ist selbstverständlich, daß die Rahmen in diesem Fall gleichgroße Aussparungen für die Kühlwasserkanäle aufweisen müssen, wie die dazugehörigen Kompartimente.

Es ist möglich, daß die Gele Zusatzstoffe, wie sie bei der Elektrophorese üblicherweise eingesetzt werden können, enthalten. Hierdurch ist es möglich, die erfindungsgemäße Elektrophoresekommer den gestellten, vielfältigen Trennproblemen anzupassen. So können beispielsweise bei der Verwendung von Polyacrylamidgelen zusätzliche funktionelle Gruppen in das Gel eingeführt werden, wie dies auch in der Technik der isoelektrischen Fokussierung in immobilisierten pH-Gradienten bekannt ist.

Das erfindungsgemäße dimensionslose Kapillarkühlsystem kann in verschiedenen Ausführungsformen vorliegen. Die bevorzugte Ausführungsform, bei der die Kapillaren fest mit den Seitenteilen der Kompartimente verbunden sind und durch Kühlwasserkanäle mit Kühlflüssigkeit versorgt werden, wurde bereits oben beschrieben.

In einer anderen Ausführungsform sind die Kapillaren jedes Kompartiments zu einer "endlos" Kapillaren verbunden und an ein Kühlflüssigkeitssystem angeschlossen.

In einer weiteren Ausführungsform ist das Kapillarkühlsystem nicht fest mit dem Kompartiment verbunden. Die Kapillaren sind in einem flachen Rahmen, der auch die Vorrichtung zur Kühlflüssigkeitsversorgung und Kühlflüssigkeitsentsorgung enthält, angeordnet. Der Rahmen ist so dimensioniert, daß er in vorgesehene Nuten des Kompartiments eingeschoben werden kann. Es ist notwendig, daß der Rahmen mit den Kapillaren parallel zu den Grenzflächen der Kompartimente angeordnet ist.

Im ersten und letzten Kompartiment sind die Elektroden (Kathode bzw. Anode) der Elektrophoresekammer angeordnet. Obwohl die Ausführung der Elektroden im Rahmen üblicher Ausführungsformen variiert werden kann, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, eine netzartig aufgebaute Elektrode einzusetzen. Ein "grobmaschiges" Netz (1-3 mm Maschenweite) aus einem inerten Material (z.B. Kunststoff), wird meanderförmig von einem leitenden Material, bevorzugt einem Platindraht, durchzogen. Geeignet sind ebenfalls Netze, die ausschließlich aus einem Platin- oder Platin-Iridium-Draht geflochten sind. Geeignet sind auch Graphit-Elektroden oder Titan-Platin-Elektroden. Die Fläche der Elektrode entspricht in etwa der Innenfläche der Kompartimente. Aufgrund der hohen Feldstärke zwischen 50 ml bis 200 Volt/cm, und der damit verbundenen Gasentwicklung im Elektrodenraum ist es vorteilhaft, wenn die beiden Kompartimente, die die beiden Elektroden enthalten, ein wesentlich größeres Volumen aufweisen als die anderen Kompartimente. Hierdurch wird zu starkes Schäumen vermieden.

Der segmentierte Aufbau der erfindungsgemäßen Elektrophoresekammer ermöglicht es, daß die Elektrolytlösung der Kompartimente mit den Elektroden eine andere Zusammensetzung aufweisen als die anderen Kompartimente. So kann beispielsweise ein höherer Gehalt eines Polyols das Schäumen im Bereich der Elektroden herabsetzen.

Die erfindungsgemäße Elektrophoresekammer wird aus einer Vielzahl von Teilen zusammengesetzt, wobei Kompartimente und Trennelemente abwechseln. Die beiden äußeren Kompartimente enthalten die beiden Elektroden. Diese schichtartig aufgebaute Elektrophoresekammer wird durch eine Spannvorrichtung zusammengehalten, um die einzelnen Bauteile (Kompartimente und Trennelemente) so abzudichten, daß keine Elektrolytlösung nach außen dringt und auch kein Flüssigkeitsaustausch zwischen benachbarten Kompartimenten erfolgen kann.

Bei der erfindungsgemäßen Elektrophoresekammer hat sich als vorteilhaft erwiesen zur antikonvektiven Stabilisierung der aufgetrennten Substanzen die Kammer mit einer 40-80% Lösung eines Polyols, z.B. Glycerin, Saccharose, Sorbit oder einem Gemisch dieser Polyole zu füllen. Die einzelnen Kompartimente werden voneinander mit gewebegestützten Polyacrylamidgelen getrennt. Bei dieser antikonvektiven Stabilisierung ist es möglich, während der Trennung aus allen Segmenten Proben zu entnehmen und nach der Trennung die Proteine ohne störende Vermischung leicht zu eluieren. Bereits bei der Einführung der isoelektrischen Fokussierung in von Polyol-Dichtegradienten stabilisierten pH Gradienten wurde gezeigt, daß hohe Polyolkonzentrationen mit der Durchführung der Elektrophorese kompatibel sind.

Inbesondere bei hoher Substanzbeladung der Kammer kann es erforderlich sein, den Inhalt der einzelnen Kompartimente mit Hilfe einer Mehrkanalpumpe ständig umzuwälzen, um auf diese Weise einer Elektrodekantation vorzubeugen. Durch Elektrodekantation würden sich aufgetrennte Substanzen im unteren Teil der Kompartimente ansammeln, was die Trennung beeinträchtigen würde und unerwünscht ist. Für eine optimale Trennung ist eine über den gesamten Querschnitt der Kompartimente gleichmäßige Verteilung der aufgetrennten Substanzen und Elektrolyte wünschenswert. Die Pumpe wird über den Abflußkanal der einzelnen Kompartimente ausgeschlossen und die umgepumpte Flüssigkeit über einen Schlauch in den oberen Teil der jeweiligen Kompartimente zurückgeführt. —

Die Kompartimentierung mit gewebegestützten Polyacrylamidgelen bietet eine Reihe von Vorteilen. Polyacrylamidgele sind eine aus analytischen Versuchen bestens bekannte Matrix, die die isoelektrische Fokussierung und andere elektrophoretische Trennungen nicht stört. Die Schichtdicke der gewebegestützten Polyacrylamidgele kann zwischen 0.05-2 mm beliebig gewählt werden. Auf diese Weise ist es möglich, das Verhältnis der flüssigen Phase zur Gelphase in der Trennkammer variabel einzustellen, was einen entscheidenden Einfluß auf die Auflösung haben kann. Die gewebegestützten Gele sind mechanisch stabil und ermöglichen eine gute Kompartimentierung. Die gewebegestützten Gele können gewaschen, getrocknet und rehydratiert werden. Die Zusammensetzung der gewebegestützten Gele kann innerhalb bestimmter Vernetzungsgrade beliebig gewählt werden.

Die Verwendung von Polyacrylamidgelen ermöglicht es auch, zusätzliche funktionelle Gruppen in das Gel einzuführen, wie dies von der Technik der isoelektrischen Fokussierung in immobilisierten pH Gradienten bekannt ist (Görg, A., Fawcett, J.S und Chrambach, A, Adv. Electrophoresis 1988, 2, 1-43).

Die Kompartimente können Sensoren zum Messen wichtiger Parameter enthalten, wie z.B. pH-Wert, Temperatur, UV, IR, Aktivitätsmessung radioaktiv markierter Proben, Leitfähigkeit u.a. Die erfindungsgemäße Elektrophoresekommer kann für den diskontinuierlichen Betrieb vollautomatisiert werden, wenn zusätzlich eine automatische Probenauftragung und Probenentnahme installiert wird.

Üblicherweise wird die erfindungsgemäße Elektrophoresekommer in horizontaler Lage betrieben. Sind die Rahmen der Kompartimente jedoch allseitig geschlossen - mit Ausnahme einer Öffnung zum Füllen und Entleeren des Kompartiments - kann die Elektrophoresekommer auch vertikal betrieben werden.

Um beispielsweise ein Protein zu trennen, wird wie folgt vorgegangen:

Von den mit Elektrolytlösung gefüllten Kompartimenten wird ein oder mehrere Kompartiment(e) geleert und mit einer Mischung der zu trennenden Probe und Elektrolytlösung gefüllt. Der Verlauf der Trennung kann entweder durch direkte Probenentnahme aus den einzelnen Kompartimenten verfolgt werden, oder aber sofern die Kompartimente geeignete Sensoren enthalten durch die erhaltenen Meßdaten. Die Isolierung der getrennten Proben erfolgt durch einfaches Entleeren der betreffenden Kompartimente.

Bei der isoelektrischen Fokussierung können alle Kompartimente entleert werden, um dann mit Probenlösung aufgefüllt zu werden. Im elektrischen Feld erfolgt dann die Auftrennung der Probe gemäß den isoelektrischen Punkten der einzelnen Komponenten.

Die Fraktionierung von Trägerampholyten ist ein wichtiger Teilschritt bei der Herstellung von Trägerampholyten für die isoelektrische Fokussierung. Mit einer hochauflösenden Trennkammer sollte es möglich sein, enge pH-Bereiche von Trägerampholyten, mit besser definierten Eigenschaften als dies mit den bisher üblichen Verfahren möglich war, herzustellen. Solche enge pH-Bereiche von Trägerampholyten sind wichtig bei Auftrennungen, in denen eine hohe Auflösung gefragt ist, wie es z.B. bei der Untersuchung genetischer Marker der Fall ist.

In mehreren Versuchen wurden Syntheseansätze der Trägerampholyte fraktioniert und die isolierten Fraktionen in analytischen Fokussierungsversuchen geprüft. Dank der ausgezeichneten Kühlleistung der neuen Trennkammer konnte der konzentrierte Syntheseansatz (35%) direkt, d.h. ohne Verdünnung, fraktioniert werden, was die bisher übliche, teure Aufkonzentrierung der verdünnt fraktionierten Trägerampholyte einsparen konnte. Nach einer Trennzeit von 44 h zeigte der pH Gradient einen annähernd linearen Verlauf, mit einem für diesen pH Bereich charakteristischen Minimum der Leitfähigkeit beim neutralen pH. Bei der analytischen Refokussierung decken sich die im Gel gemessenen pH Gradienten mit den im präparativen Versuch isolierten pH Bereich, mit zum Teil ausgezeichneter Linearität über einen engen pH Bereich (z.B. der Bereich pH 3-4).

Die Fraktionierung von Trägerampholyten zeigt, daß es in der neuen Trennkammer möglich ist, Trennungen auch bei hoher Leitfähigkeit der Probe oder der Pufferelektrolyte durchzuführen. Solche Trennungen könnten auch bei anderen niedermolekularen Substanzen von Interesse sein.

Für die Auftrennung verschiedener Proteine müssen jeweils der pH Gradient und das Vh Produkt optimiert werden. Dies setzt eine Stabilität der pH Gradienten im elektrischen Feld voraus. In einem Versuch in pH 4-9 Servalyt Trägerampholyten war der pH Gradient für Vh Produkte von 6000 - 13000 Vh konstant. Bei präparativer Refokussierung enger pH Bereiche deckt sich der pH Bereich mit dem ursprünglich isolierten Bereich. Dieser Versuch zeigt, daß eine Kaskadenfokussierung in zwei und mehr Schritten möglich ist, was die Auflösung bei schwer trennbaren Komponenten entscheidend verbessern könnte.

Wie in der Abbildung 1 dargestellt, ist die erfindungsgemäße Elektrophoresekammer durch einen modularen Aufbau gekennzeichnet. Auf einer Bodenplatte (1) sind die Kompartimente (2) nacheinander angeordnet, wobei in dieser Zeichnung die Trennelemente, die sich zwischen zwei Kompartimenten befinden, nicht dargestellt sind. Im Anschluß an die Kompartimente, die die Elektroden (3) enthalten, befinden sich zwei stabile Endblöcke (4), die Vorrichtungen (5) zur Aufnahme zweier Führungsschienen (6) aufweisen. Die Platten, die Führungsschienen und das Endteil (8) ermöglichen eine Fixierung der einzelnen Kompartimente, so daß eine flüssigkeitsdichte Elektrophoresekammer gebildet wird. Die Führungsschienen können, sofern sie als runden Stab oder als Rohr ausgebildet sind, ein Gewinde enthalten.

Das Endstück (8) wird aufgesteckt und mit den Muttern verschraubt, wodurch der erforderliche Druck über das auf den Führungsschienen bewegliche Endstück auf die Elektrophoresekammer ausgeübt wird. Die Endblöcke (4) dienen gleichzeitig dazu, die Aussparungen (7) für die beiden Kühlwasserkanäle abzudichten, damit die Kühlflüssigkeit nicht ausläuft. Ebenfalls enthalten die Endblöcke Vorrichtungen (9), um das Kapillarkühlsystem (11) an einen Kryostaten oder eine andere Kühlflüssigkeitsversorgung anzuschließen (in der Zeichnung nicht dargestellt). Dichtungen (12) zwischen den Kompartimenten (2) verhindern, daß Flüssigkeit austritt. Die Aussparungen (7) bilden zwei gegenüberliegende Kühlflüssigkeitskanäle. Die elektrischen Zuleitungen zu den Elektroden sind in der Zeichnung ebenfalls nicht abgebildet. Der Zusammenhalt der Kompartimente kann selbstverständlich durch entsprechende technisch äquivalente Vorrichtungen hergestellt werden.

Die Kompartimente sind - bis auf eine Ausnahme - nur im Aufriß abgebildet, um den Aufbau der erfindungsgemäßen Elektrophoresekammern deutlicher darzustellen.

Im Allgemeinen besteht die Kammer aus mindestens 5 Kompartimenten, da eine geringere Anzahl zwar möglich, aber aus Sicht der Trennleistung nur in Ausnahmefällen sinnvoll ist. Verkürzte Trennstrecken mit 5 oder weniger Kompartimenten sind dann sinnvoll, wenn sie in sogenannten Kaskaden eingesetzt werden. In einer ersten Elektrophoresekammer erfolgt eine erste Auftrennung der Probe, wobei anschließend der Inhalt eines Kompartiments in einer weiteren Elektrophoresekammer weiter fraktioniert wird. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden.

Die Kombination mehrerer Elektrophoresekammern mit einer geringen Anzahl von Kompartimenten zu einer Kaskade ermöglicht beispielsweise die schnelle Auftrennung eines Proteingemisches.

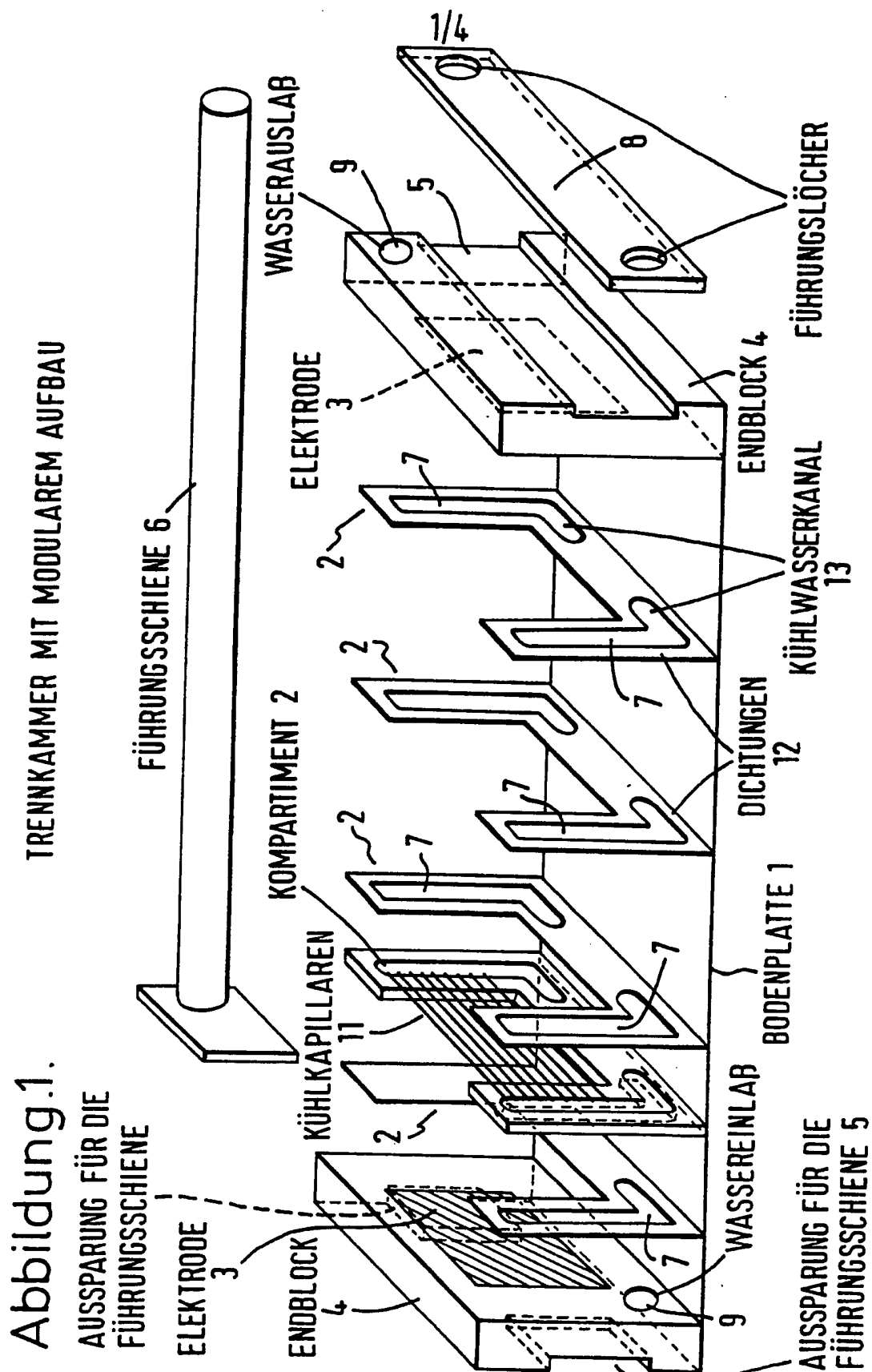
In Abbildung 2 ist ein Schnitt durch ein Kompartiment (2) mit fest eingebautem Kapillarkühlsystem dargestellt. Zwei Seitenteile (14) und ein Bodenteil (15) sind zu einem Rahmen (16) verbunden. Das Bodenteil weist eine unterschiedliche Dicke auf, am tiefsten Punkt befindet sich ein verschließbarer Abflußkanal (17), über den auch eine Mehrkanalpumpe angeschlossen werden kann, um den Inhalt der einzelnen Kompartimente zur Vermeidung einer Elektrodekantation umzuwälzen. In den Seitenteilen sind Öffnungen (7) vorhanden. Durch die Kombination mehrerer Rahmentteile werden somit die Kühlwasserkanäle gebildet. Die Kapillaren (18) sind fest mit den Seitenteilen (14) verbunden.

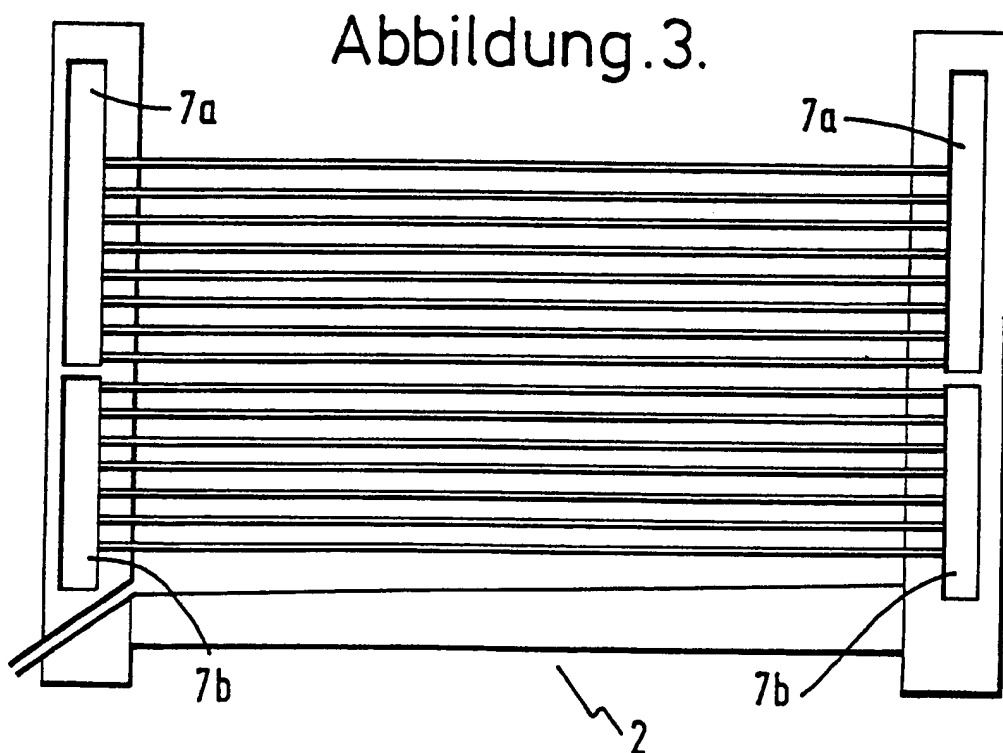
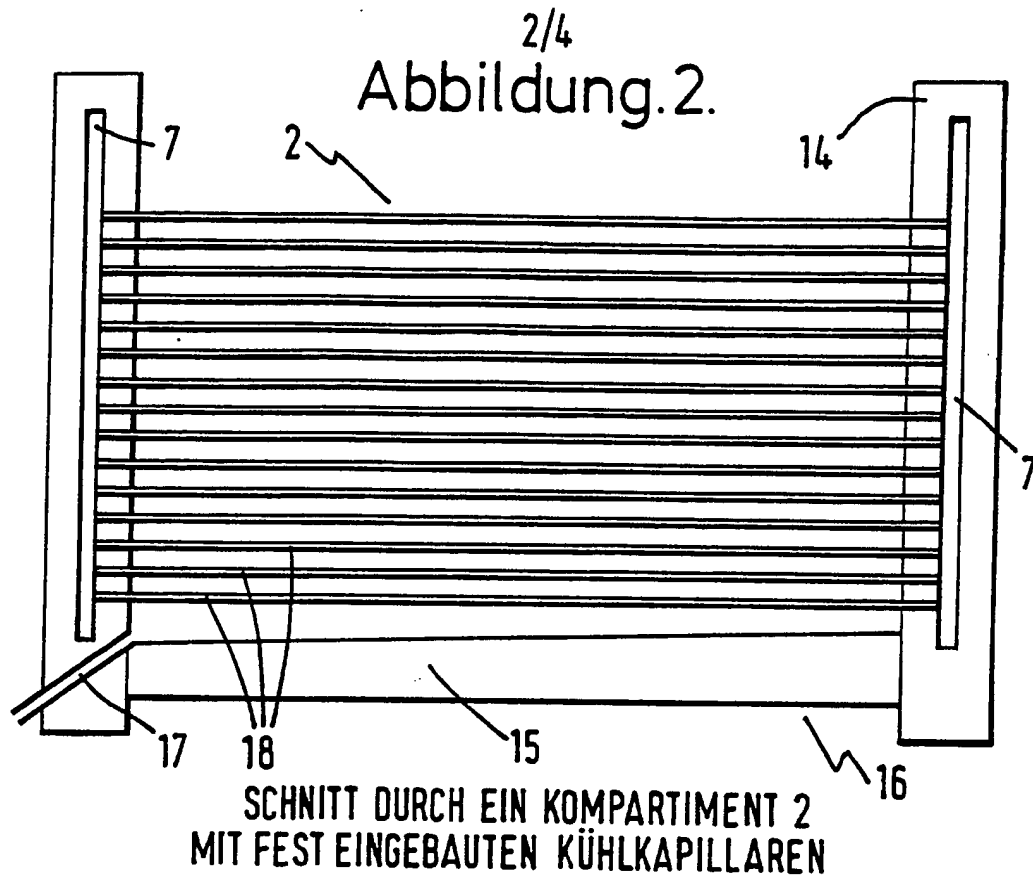
Abbildung 3 zeigt einen Schnitt durch ein Kompartiment (2) mit unterteilten Öffnungen (7a) und (7b) zur Ausbildung getrennter Kühlflüssigkeitskanäle. Zur effektiveren Kühlung können diese beispielsweise gegenläufig mit Kühlflüssigkeit beschickt werden. Abbildung 4 zeigt ein Trennelement (19) mit einem fest eingebauten gewebe gestützten Gel (20). Die Seitenteile (21) enthalten Aussparungen (22) zur Bildung von Kühlwasserkanälen. Die Seitenteile (21), das Bodenteil (25) und ein oberes Teil (23) bilden einen festen Rahmen (24), um das Gewebe, auf dem das Gel aufpolymerisiert ist, zu stützen.

Patentansprüche

- 1) Vorrichtung für die präparative Elektrophorese, gekennzeichnet durch einen modularen Aufbau der Elektrolytkammer aus einer Vielzahl von Kompartimenten, wobei die einzelnen Kompartimente durch Elemente (Trennelemente) mit membranartigen Eigenschaften voneinander getrennt sind und jedes Kompartiment ein aus parallel angeordneten Kapillaren bestehendes Kühlelement enthält.
- 2) Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Trennelement aus einem Polymerfilm mit membranartigen Eigenschaften besteht.
- 3) Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Trennelement aus einem gewebegetützten Polyacrylamid- oder Agarosegel besteht.
- 4) Dimensions-unabhängiges Kühlsystem für die präparative Elektrophorese, dadurch gekennzeichnet, daß es parallel angeordnete Kühlkapillaren geringen Außendurchmessers in geringem Abstand zueinander angeordnet enthält.
- 5) Dimensions-unabhängiges Kühlsystem nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillaren aus Stahl bestehen und mit einem elektrisch nichtleitenden Material überzogen sind.
- 6) Dimensionsunabhängiges Kühlsystem nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillaren aus Kunststoff bestehen.

- 7) Elektrophoresekammer, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus
- a) mindestens 5 - mit parallel angeordneten Kühlkapillaren geringen Abstandes versehenen - Kompartimenten,
 - b) zwei Kompartimenten, zur Aufnahme der Elektroden,
 - c) einer Vorrichtung für die Versorgung der Kapillaren mit Kühlflüssigkeit, und
 - d) einer Vorrichtung zum Zusammenhalt der Kompartimente
- besteht.
- 8) Elektrophoresekammer gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie Vorrichtungen zum Durchmischen des Elektrolyten in den einzelnen Kompartimenten zur Vermeidung der Elektrodekantation enthält.
- 9) Elektrophoresekammer nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Mehrkanalpumpe zur Durchmischung des Elektrolyten in den einzelnen Kompartimenten zur Vermeidung der Elektrodekantation in den einzelnen Kompartimenten enthält.





3/4

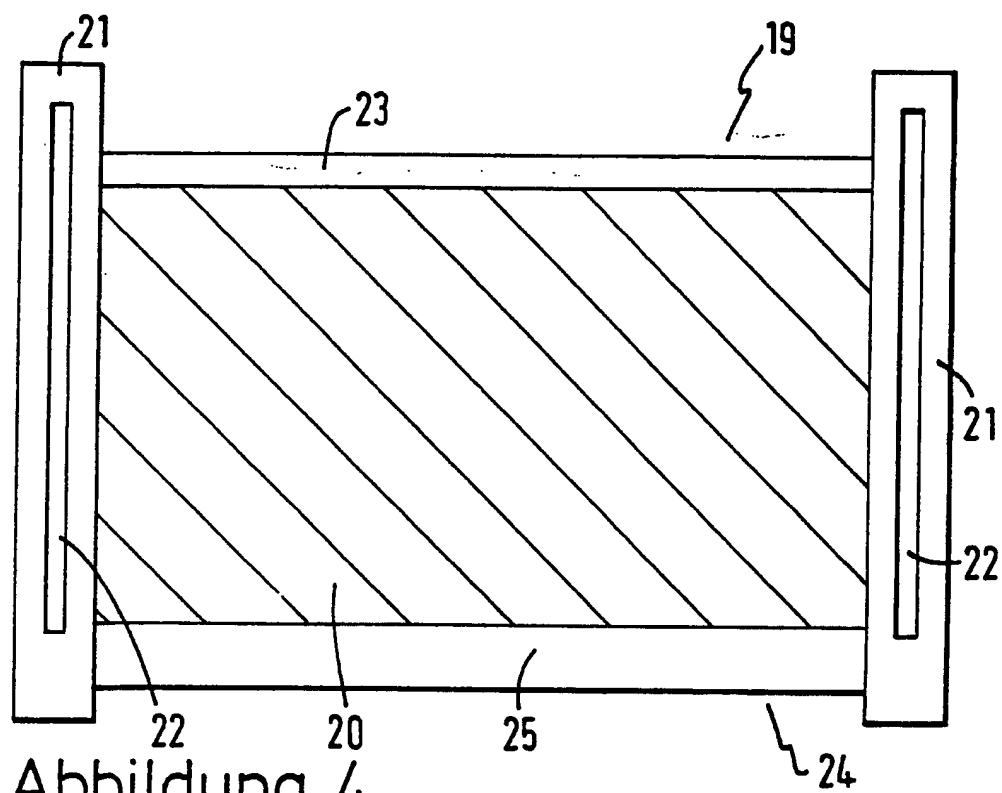
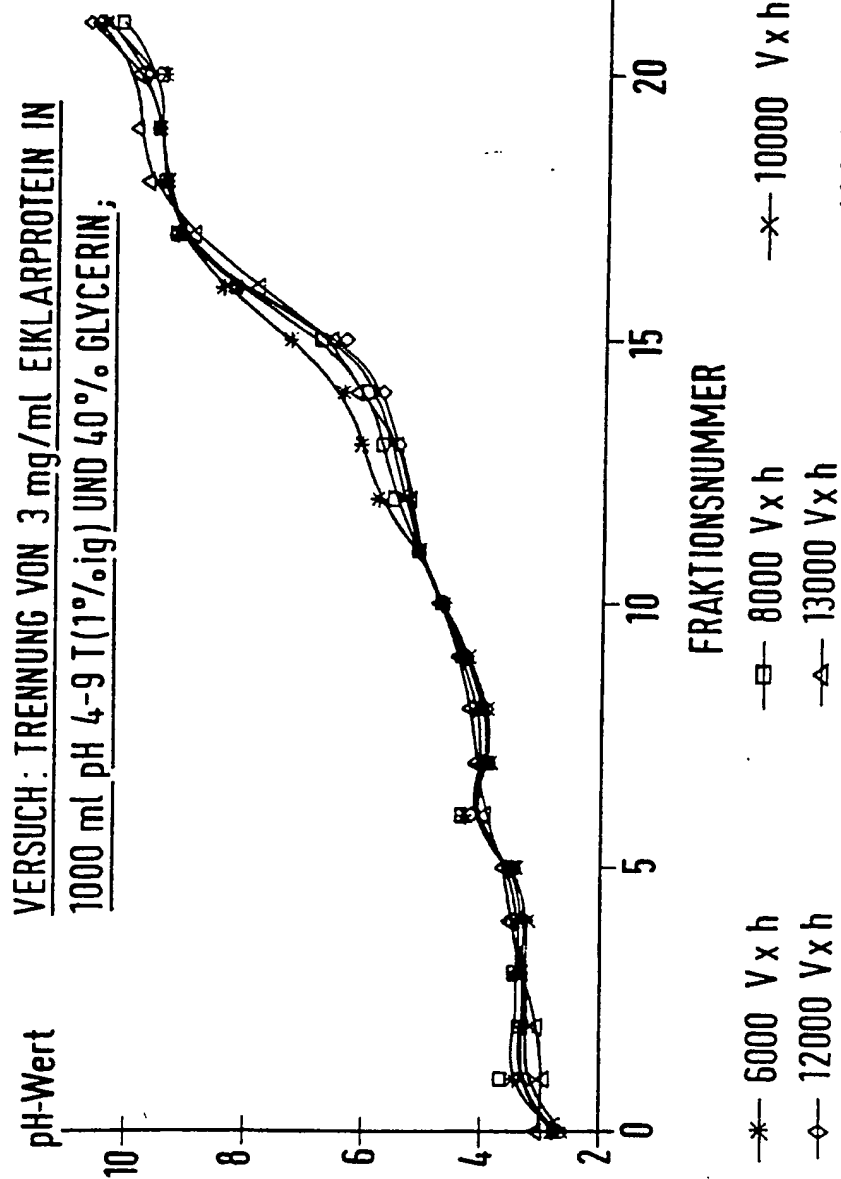


Abbildung .4.

Abbildung.5. STABILITÄT DES pH GRADIENTEN BEI DER PRÄPARATIVEN ISOELEKTRISCHEN FOKUSSIERUNG BEI UNTERSCHIEDLICHEN V_h PRODUKTEN



ANODE: 1%. pH 3-4 IN 80%. GLYCERIN
KATHODE: 1%. pH 9-11 T IN 80%. GLYCERIN

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/01219

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ B 01 D 57/02 G 01 N 27/26		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	B 01 D 57/00 G 01 N 27/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
P,X	WO,A,9104085 (SEPARATIONS TECHNOLOGY) 4 April 1991, see the whole document ---	1
A	EP,A,0368513 (B.P.) 16 May 1990 ---	
A	GB,A,2006269 (HAHN-MEITNER-INSTITUT FÜR KERNFORSCHUNG BERLIN) 2 May 1979 ---	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
30 September 1991 (30.09.91)	23 October 1991 (23.10.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9101219
SA 48719

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 17/10/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 9104085	04-04-91	US-A- 5032247	16-07-91
		EP-A- 0443024	28-08-91
EP-A- 0368513	16-05-90	AU-A- 4372889	10-05-90
		JP-A- 2172525	04-07-90
GB-A- 2006269	02-05-79	DE-A- 2746089	19-04-79
		BE-A- 871202	01-02-79
		FR-A- 2410060	22-06-79
		JP-A- 54062179	18-05-79
		NL-A- 7810175	18-04-79
		SE-A- 7810664	13-04-79
		US-A- 4177130	04-12-79

I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC
 Int.C1.5 B 01 D 57/02 G 01 N 27/26

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETERecherchierter Mindestprüfstoff ⁷

Klassifikationssystem

Klassifikationssymbole

Int.C1.5

B 01 D 57/00

G 01 N 27/00

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹

Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
P,X	WO,A,9104085 (SEPARATIONS TECHNOLOGY) 4. April 1991, siehe das ganze Dokument ---	1
A	EP,A,0368513 (B.P.) 16. Mai 1990 ---	
A	GB,A,2006269 (HAHN-MEITNER-INSTITUT FÜR KERNFORSCHUNG BERLIN) 2. Mai 1979 -----	

¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden; wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30-09-1991

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23 OCT 1991

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten

HANS T. TAZELAAR

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9101219
SA 48719

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 17/10/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A- 9104085	04-04-91	US-A- 5032247	16-07-91
		EP-A- 0443024	28-08-91
EP-A- 0368513	16-05-90	AU-A- 4372889	10-05-90
		JP-A- 2172525	04-07-90
GB-A- 2006269	02-05-79	DE-A- 2746089	19-04-79
		BE-A- 871202	01-02-79
		FR-A- 2410060	22-06-79
		JP-A- 54062179	18-05-79
		NL-A- 7810175	18-04-79
		SE-A- 7810664	13-04-79
		US-A- 4177130	04-12-79

EPD FORM P473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82